

(19) REPUBLIC OF FRANCE

NATIONAL INSTITUTE
OF INDUSTRIAL PROPERTY

PARIS

(11) Publication No.: 2,633,398
(to be used only for ordering
copies)

(21) National Registration No.:
88 08517

(51) Int. Cl⁴: G 01 N 33/566

(12) APPLICATION FOR PATENT OF INVENTION A1

(22) Date filed: June 24, 1988

(30) Priority:

(43) Date the application was laid open to public inspection: BOPI "Brevets"
[Patents] No. 52 of December 29, 1989

(60) References to other relevant national documents:

(71) Applicant(s): BIOKEMA S.A. - CH.

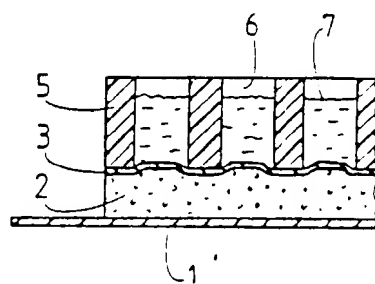
(72) Inventor(s): Clément Bordier.

(73) Proprietor(s):

(74) Agent(s): Bugnion Associates

(54) TEST ASSEMBLY FOR BIOCHEMICAL ANALYSIS

(57) Test assembly for biochemical analysis by means of a membrane 3 onto which biological molecules are fixed by adsorption. Membrane 3 is attached onto a thin layer of synthetic foam 2, which is in turn attached onto a rigid support 1. A perforated plate 5 is applied with pressure onto membrane 3 so as to form wells 6 functioning as individual incubation chambers for diluted samples 7 to be analyzed. The test assembly permits conducting a large series of reactions in a rational manner.



The present invention has for a subject a test assembly for biochemical analysis by means of a membrane onto which biological molecules are fixed by adsorption.

The adsorption of proteins, nucleic acids and other biological molecules on solid supports is used in numerous techniques of biochemical analysis. Porous supports, presented in the form of membranes, permit adsorbing macromolecules by hydrophobic, electrostatic or covalent interactions. These membranes, however, are often fragile and difficult to handle.

In biochemical analyses where the reactions take place in solid phase, one generally looks for the presence, in the sample to be tested, of one or more molecules of a ligand capable of reacting with the biological macromolecules fixed on the membrane. The presence of the ligand is detected by means of a probe (radioactive, coupled to an enzyme, colored, fluorescent, etc.) either directly, or by competition. The majority of techniques require successive incubations alternating with washings. The same test is often conducted on a series of samples. In this case, it is important to note that, in general, only one of the incubations, that of the diluted material to be analyzed, is specific for a given sample. In contrast, during washings and other incubations, all the other tests are processed parallelly and in an identical manner.

For this purpose, plates of synthetic material of standardized dimensions are generally used, known under the name ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) plates, in which 8 x 12 wells of 7 mm diameter are formed. The biological molecules are adsorbed by the plastic. All the steps of

the reaction take place individually in each well, which renders large-series analyses time-consuming and fastidious.

The object of the present invention is to offer a test assembly permitting testing a series of samples in a much more rational and rapid manner than with the known means.

The test assembly according to the invention is characterized by the fact that it comprises a rigid planar support onto which is attached a layer of synthetic foam with closed cells, of uniform thickness, on which the membrane itself is attached onto which the biological molecules are fixed by adsorption according to a particular geometric configuration, a perforated plate with cylindrical holes open on both ends and arranged according to a configuration corresponding to the configuration of biological molecules on the membrane, the perforated plate being designed to be applied and pressed onto the foam so as to form wells that do not communicate with one another.

The configuration according to which the biological molecules are fixed onto the membrane can be, for example, an assembly of parallel lines or a matrix of points to which the holes of the perforated plate correspond.

The test assembly according to the invention permits conducting a large series of reactions in a particularly rational manner. In comparison to the use of conventional ELISA on microplates, the test assembly according to the invention also presents several advantages:

The support can be cut to measure and adapted to the number of samples to be analyzed.

At the position of the wells which contain the sample, a signal is detected, which is specific for the ligand of the sample on the biological macromolecules fixed on the membrane, as well as background noise due to non-specific adsorptions of the ligand and other reagents in the zone of the membrane not containing the macromolecules specific to the test.

Reagents or macromolecules that permit controlling the functioning of the test can be applied onto the membrane.

After the specific incubation, all the samples are treated in parallel in common incubations, thus accelerating the manipulations by sparing pipetting steps and improving the comparison of results from different samples.

The results can be evaluated visually or by photometry.

The support can be kept for documentation.

The attached drawing shows, by way of example, one form of embodiment of the invention.

Figure 1 is a planar view of the rigid support with its membrane in which is schematically shown the distribution of biological macromolecules.

Figure 2 is an elevational and sectional view, in larger scale, of the support of Figure 1 and the perforated plate before its application onto the support.

Figure 3 is a planar view of the perforated plate applied onto the support.

Figure 4 is an elevational and sectional view, in larger scale, of the assembly shown in Figure 3.

Figure 5 shows the support after reaction.

The support shown in Figures 1 and 2 is made up of a rigid plate 1, preferably of synthetic material, which can be cut with a pair of scissors, and onto which is glued a layer of synthetic foam 2 with closed cells, of a thickness of 1.5 mm, adhesive on both of its surfaces, onto which is glued in turn a porous membrane 3. This porous membrane for example, is made up of a 0.2 μ nitrocellulose filter from SCHLEICHER and SCHUELL BA 83. The biological macromolecules fixed by adsorption onto porous membrane 3 are distributed according to parallel lines 4. Indications on the nature and the position of biological macromolecules are inscribed on the free part of plate 1.

The test assembly also comprises a plate 5 of synthetic material pierced with parallel cylindrical holes 6 arranged in a matrix, the distance separating the rows of holes corresponding to the distance between two lines 4 of the macromolecules on the support. The density of the foam as well as the density of the subassembly comprised of plate 1, foam 2 and membrane 3 is less than 1 g/cm³ so as to permit the assembly of elements 1, 2 and 3 to float on the surface of the liquid during non-specific incubations, thus minimizing the quantity of reagents necessary for the incubations.

In order to conduct the specific incubation of the samples, perforated plate 5 is applied onto porous membrane 3, by holding it pressed onto the support, as shown in Figure 4, so as to form wells 6 completely separate from one another; foam 2, which is compressed, assures the tight seal at the end of the holes of the plate, to prevent contamination of one sample by another during the specific incubation. The pressure can be supplied by an ordinary pair of spring clamps.

The samples to be analyzed are introduced in diluted form 7 into each of wells 6, which function as individual incubation chambers for the different samples to be analyzed.

After the specific incubation, the matrix of tubes 5 is separated from support 1 and the latter is then incubated with reagents common to all the samples (washings, conjugates, substrates, etc.) For this purpose, the support and its membrane are inverted, membrane 3 toward the bottom, on the top of appropriate reagents on which support 1 and membrane 3 float due to the low density of foam 2.

The result is read visually or by photometry by evaluating the reaction having occurred in the zone where the biological macromolecules are adsorbed. This visualization is illustrated in Figure 5, where colored segments 8, 9, 10 and 11 corresponding to specific wells 6 are shown. If the reaction has also occurred on control molecules applied to other configurations on the membrane, the good functioning of the test can be judged.

The assembly according to the invention is susceptible to numerous variations of embodiment. In particular, the biological macromolecules could be fixed onto membrane 3 according to a matrix of points corresponding to the matrix of holes of perforated plate 6 or according to any other particular configuration that would correspond to a similar configuration of holes. The perforated plate could also be made in another manner. Membrane 3 need not necessarily be porous; a non-porous film may be suitable.

CLAIMS

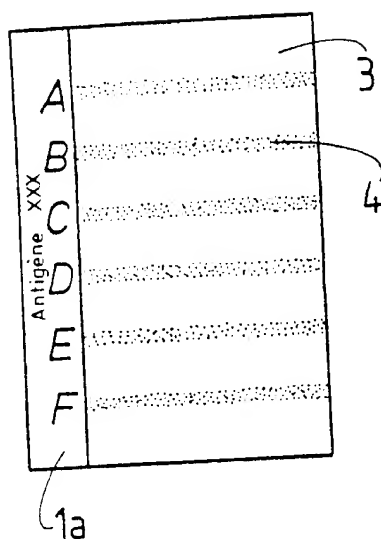
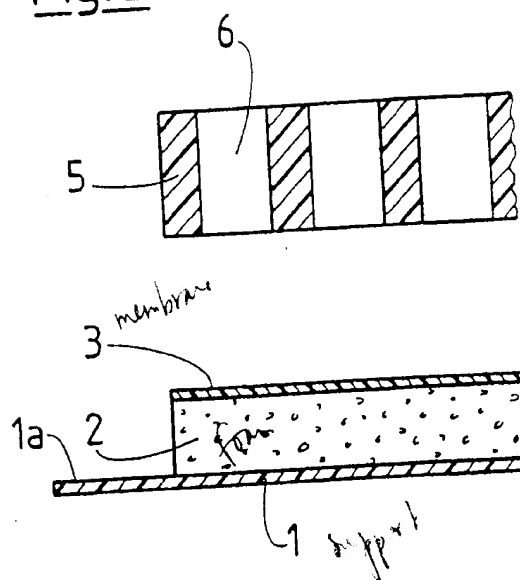
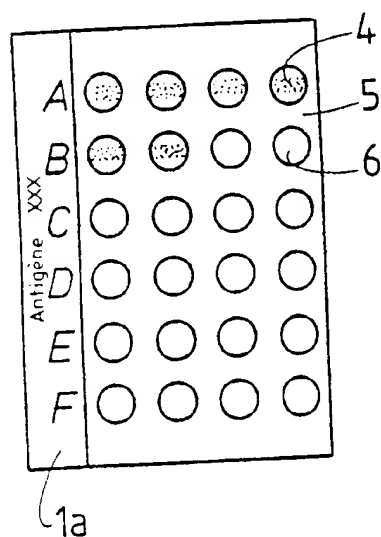
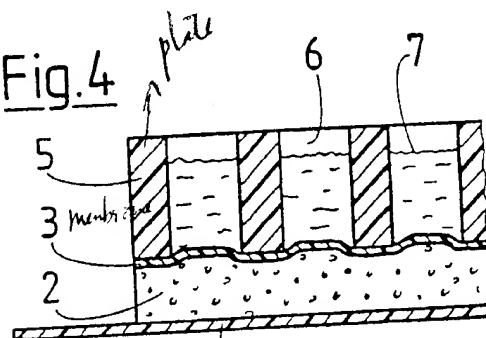
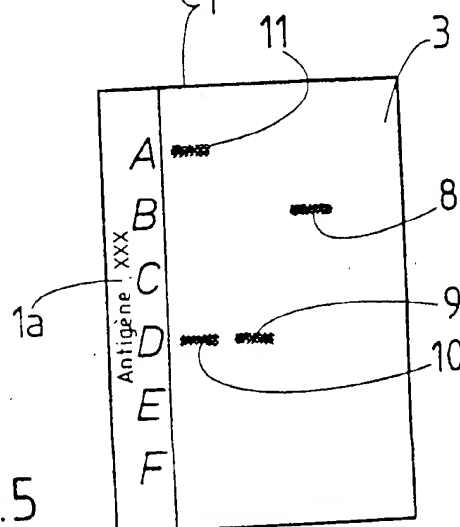
1. Test assembly for biochemical analysis by means of a membrane onto which biological molecules are fixed by adsorption, characterized by the fact that it comprises, on the one hand, a rigid planar support (1) onto which is attached a layer of synthetic foam (2) with closed cells, of uniform thickness, onto which said membrane (3) is attached in turn, onto which the biological molecules are fixed by adsorption according to a particular geometric configuration (4), and, on the other hand, a plate perforated with cylindrical holes (5, 6) open on both of their ends and arranged according to a configuration corresponding to the configuration of the biological molecules on the perforated plate, and this perforated plate is designed to be applied and pressed onto the foam so as to form wells (6) that do not communicate with one another.
2. Assembly according to claim 1, further characterized by the fact that the configuration of biological molecules adsorbed is a collection of straight parallel lines (4) and that the configuration of holes (6) is a matrix whose rows correspond to said straight lines.
3. Assembly according to claim 1, further characterized by the fact that the configuration of biological molecules adsorbed is a matrix of points and that the configuration of holes is a similar matrix.
4. Assembly according to claims 2 or 3, further characterized by the fact that the rigid rectangular support (1) laterally projects beyond the foam, the

projecting edge (1a) bearing indications on the nature and the position of biological macromolecules fixed onto the membrane.

5. Assembly according to one of claims 1 to 4, further characterized by the fact that the density of the subassembly constituted by the rigid plate, the foam and the membrane is less than the density of water.

Single Sheet

In figs: Antigène = antigen

Fig. 1Fig. 2Fig. 3Fig. 4Fig. 5

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

(11) N° de publication :
 (à n'utiliser que pour les
 commandes de reproduction)

2 633 398

(21) N° d'enregistrement national :

88 08517

(51) Int Cl^a : G 01 N 33/566.

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(12)

(22) Date de dépôt : 24 juin 1988.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
 demande : BOPI « Brevets » n° 52 du 29 décembre 1989.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
 rentés :

(71) Demandeur(s) : BIOKEMA S.A. — CH.

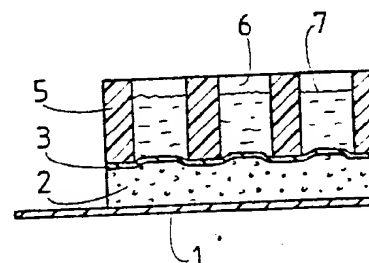
(72) Inventeur(s) : Clément Bordier.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Bugnion Associés.

(54) Ensemble de test pour analyse biochimique.

(57) Ensemble de test pour analyse biochimique au moyen
 d'une membrane 3 sur laquelle sont fixées par adsorption des
 molécules biologiques 4. La membrane 3 est fixée sur une
 couche de mousse synthétique 2 elle-même fixée sur un
 support rigide 1. Une plaque perforée 5 est appliquée, avec
 pression, sur la membrane 3 de manière à former des puits 6
 fonctionnant comme autant de chambres d'incubation indivi-
 duelles pour les échantillons dilués 7 à analyser. L'ensemble de
 test permet d'effectuer des réactions en grande série de façon
 rationnelle.



FR 2 633 398 - A1

2633398

La présente invention a pour objet un ensemble de test pour analyse biochimique au moyen d'une membrane sur laquelle sont fixées par adsorption des molécules biologiques.

5

L'adsorption de protéines, acides nucléiques et autres molécules biologiques sur des supports solides est utilisée dans de nombreuses techniques d'analyse biochimique. Les supports poreux, se présentant sous la forme
10 de membranes, permettent d'adsorber des macromolécules par interactions hydrophobes, électrostatiques ou covalentes. Ces membranes sont cependant souvent fragiles et difficiles à manipuler.

15 Dans les analyses biochimiques où les réactions ont lieu en phase solide, on recherche en général la présence, dans l'échantillon à tester, d'une ou plusieurs molécules d'un ligand capable de réagir avec les macromolécules biologiques fixées sur la membrane. La détection de la présence du ligand se fait à l'aide d'une
20 sonde (radioactive, couplée à une enzyme, colorée, fluorescente, etc.) soit directement, soit par compétition. La plupart des techniques requièrent des incubations successives alternant avec des lavages. Le même
25 test est souvent pratiqué sur des séries d'échantillons. Dans ce cas, il est important de noter qu'en général une seule incubation, celle de la dilution du matériel à analyser, est spécifique pour un échantillon donné. Par contre, lors des lavages et autres incubations,
30 tous les tests sont traités en parallèle et de manière identique.

On utilise généralement à cet effet des plaques en matière synthétique de dimensions normalisées, connues
35 sous le nom de plaques à ELISA (Enzyme Linked Immuno-

2633398

sorbent Assay), dans lesquelles sont formées 8 x 12 puits de 7 mm de diamètre. Les molécules biologiques sont adsorbées par le plastique. Toutes les étapes de la réaction ont lieu individuellement dans chaque puits, ce qui rend les analyses en grande série longues et fastidieuses.

La présente invention a pour but d'offrir un ensemble de test permettant de tester des séries d'échantillons de façon beaucoup plus rationnelle et rapide qu'avec les moyens connus.

L'ensemble de test selon l'invention est caractérisé par le fait qu'il comprend un support plan rigide sur lequel est fixée une couche de mousse synthétique à cellules fermées d'épaisseur uniforme, sur laquelle est elle-même fixée ladite membrane sur laquelle les molécules biologiques sont fixées par adsorption selon une configuration géométrique particulière, une plaque perforée de trous cylindrique ouverts à leurs deux extrémités et disposés selon une configuration correspondant à la configuration des molécules biologiques sur la membrane, la plaque perforée étant destinée à être appliquée et pressée sur la mousse de manière à former des puits sans communication les uns avec les autres.

La configuration selon laquelle les molécules biologiques sont fixées sur la membrane peut être par exemple un ensemble de lignes parallèles ou une matrice de points à laquelle correspondent les trous de la plaque perforée.

L'ensemble de test selon l'invention permet d'effectuer des réactions en grandes séries de façon particulièrement rationnelle. Par rapport à l'utilisation d'ELISA

2633398

conventionnelle en microplaque, l'ensemble de test selon l'invention présente en outre plusieurs avantages :

5 Le support peut être coupé sur mesure et adapté au nombre d'échantillons à analyser.

A la position du puits ayant contenu l'échantillon on détecte un signal spécifique du ligand de l'échantillon sur les macromolécules biologiques fixées sur la membrane, ainsi que le bruit de fond dû aux adsorptions non spécifiques du ligand et des autres réactifs dans la zone de la membrane ne contenant pas les macromolécules spécifiques au test.

15 Des réactifs ou macromolécules permettant de contrôler le fonctionnement du test peuvent être appliqués sur la membrane.

20 Après l'incubation spécifique, tous les échantillons sont traités en parallèle dans des incubations communes, accélérant ainsi les manipulations par économie de pipettage et améliorant la comparaison des résultats de différents échantillons.

25 Les résultats peuvent être évalués visuellement ou par photométrie.

Le support peut être conservé comme document.

30 Le dessin annexé représente, à titre d'exemple, une forme d'exécution de l'invention.

La figure 1 est une vue en plan du support rigide avec sa membrane dans laquelle on a représenté schématiquement la répartition des macromolécules biologiques.

La figure 2 est une vue en élévation et en coupe, à plus grande échelle, du support de la figure 1 et de la plaque perforée avant son application sur le support.

- 5 La figure 3 est une vue en plan de la plaque perforée appliquée sur le support.

La figure 4 est une vue, à plus grande échelle, en élévation et en coupe de l'ensemble représenté à la figure
10 3.

La figure 5 représente le support après réaction.

Le support représenté aux figures 1 et 2 est constitué
15 d'une plaque rigide 1, de préférence en matière synthétique, susceptible d'être découpée avec une paire de ciseaux, et sur laquelle est collée une couche de mousse synthétique 2 à cellules fermées, d'une épaisseur de 1,5 mm, adhésive sur ses deux faces, sur laquelle est
20 elle-même collée une membrane poreuse 3. Cette membrane poreuse est constituée, par exemple, par un filtre en nitrocellulose de 0,2 μ de SCHLEICHER et SCHUELL BA 83. Les macromolécules biologiques fixées par adsorption sur la membrane poreuse 3 sont réparties selon des lignes parallèles 4. Sur une partie libre 1a de la plaque
25 1 sont imprimées des indications sur la nature et la position des macromolécules biologiques.

L'ensemble de test comprend en outre une plaque 5 en
30 matière synthétique percée de trous cylindriques parallèles 6 disposés en matrice, la distance séparant les rangées de trous correspondant à la distance entre deux lignes 4 de macromolécules biologiques sur le support. La densité de la mousse ainsi que la densité du sous-

2633398

ensemble constitué par la plaque 1, la mousse 2 et la membrane 3 est inférieure à 1 g/cm^3 de manière à permettre à l'ensemble des éléments 1, 2 et 3 de flotter à la surface du liquide pendant les incubations non spécifiques, minimisant ainsi la quantité de réactifs nécessaires aux incubations.

Pour procéder à l'incubation spécifique des échantillons, on applique la plaque perforée 5 sur la membrane poreuse 3, en la maintenant pressée sur le support, comme représenté à la figure 4, de manière à former des puits 6 complètement séparés les uns des autres, la mousse 2, comprimée, assurant l'étanchéité à l'extrémité des trous de la plaque, pour empêcher la contamination d'un échantillon par un autre pendant l'incubation spécifique. La pression peut être assurée par une paire de pinces à ressort usuelles. Les échantillons à analyser sont introduits sous forme diluée 7 dans chacun des puits 6 qui fonctionnent comme autant de chambres d'incubation individuelles pour les différents échantillons à analyser.

Après l'incubation spécifique, la matrice de tubes 5 est séparée du support 1 et celui-ci est ensuite incubé avec les réactifs communs à tous les échantillons (lavages, conjugués, substrats, etc.). A cet effet le support et sa membrane sont déposés à l'envers, membrane 3 vers le bas, sur les réactifs correspondants sur lesquels le support 1 et sa membrane 3 flottent en raison de la faible densité de la mousse 2.

La lecture du résultat se fait visuellement ou par photométrie en évaluant la réaction ayant eu lieu dans la zone où les macromolécules biologiques sont adsorbées. Cette visualisation est illustrée à la figure 5, où

2633398

L'on a représenté des segments colorés 8, 9, 10 et 11 correspondant à des puits 6 déterminés. La réaction ayant eu lieu sur les molécules de contrôle appliquées en d'autres configurations sur la membrane permet de
5 juger du bon fonctionnement du test.

L'ensemble selon l'invention est susceptible de nombreuses variantes d'exécution. En particulier, les macromolécules biologiques pourraient être fixées sur la
10 membrane 3 selon une matrice de points correspondant à la matrice des trous de la plaque perforée 6 ou selon toute autre configuration particulière à laquelle correspondrait une configuration semblable des trous. La plaque perforée pourrait être également réalisée d'une
15 autre manière. La membrane 3 ne doit pas nécessairement être poreuse, un film non poreux peut convenir.

REVENDEICATIONS

1. Ensemble de test pour analyse biochimique au moyen d'une membrane sur laquelle sont fixées par adsorption des molécules biologiques, caractérisé par le fait qu'il comprend, d'une part, un support plan rigide (1) sur lequel est fixée une couche de mousse synthétique (2) à cellules fermées d'épaisseur uniforme, sur laquelle est elle-même fixée ladite membrane (3) sur laquelle les molécules biologiques sont fixées par adsorption selon une configuration géométrique particulière (4), et, d'autre part, une plaque perforée de trous cylindriques (5, 6) ouverts à leurs deux extrémités et disposés selon une configuration correspondant à la configuration des molécules biologiques sur la plaque perforée étant destinée à être appliquée et pressée sur la mousse de manière à former des puits (6) sans communication les uns avec les autres.
2. Ensemble selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la configuration des molécules biologiques adsorbées est un ensemble de lignes droites parallèles (4) et que la configuration des trous (6) est une matrice dont les rangées correspondent auxdites lignes droites.
3. Ensemble selon la revendication 1, caractérisé par le fait que la configuration des molécules biologiques adsorbées est une matrice de points et que la configuration des trous est une matrice semblable.
4. Ensemble selon la revendication 2 ou 3, caractérisé par le fait que le support rigide, rectangulaire (1), dépasse latéralement la mousse, le bord dépassant (1a) portant des indications sur la nature et la position des macromolécules biologiques fixées sur la membrane.

5. Ensemble selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que la densité du sous-ensemble constitué de la plaque rigide, de la mousse et de la membrane est inférieure à la densité de l'eau.

2633398

Fig. 1

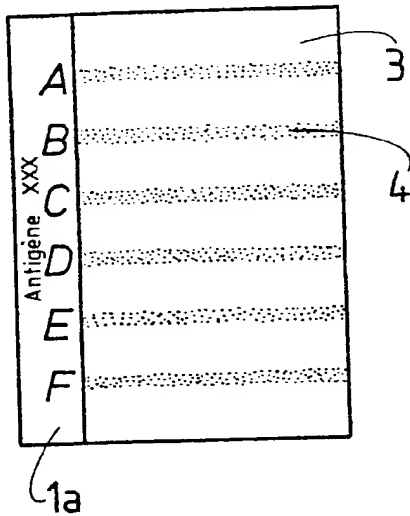


Fig. 2

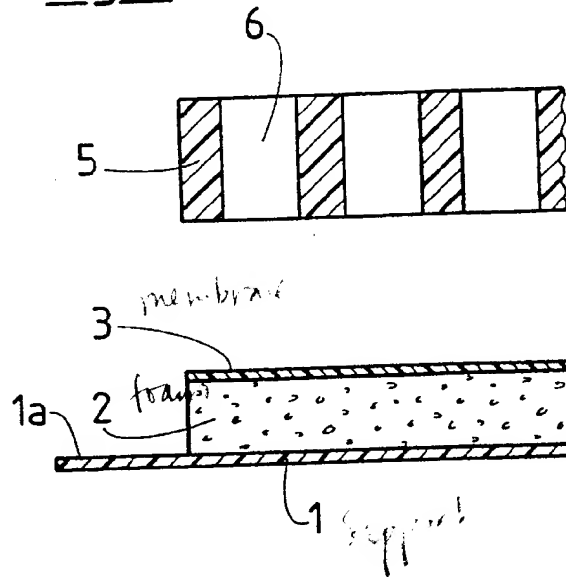


Fig. 3

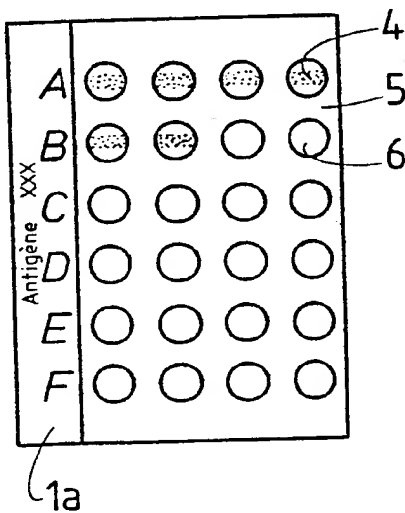


Fig. 4

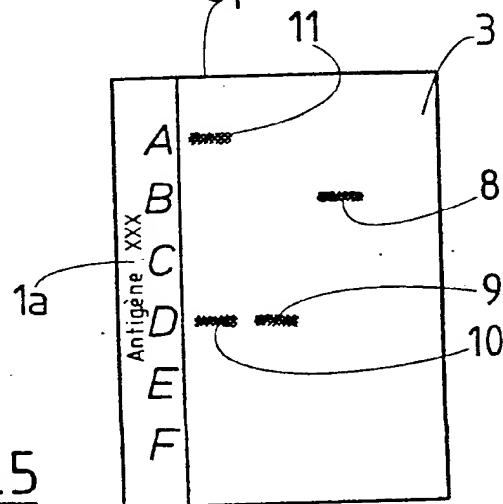
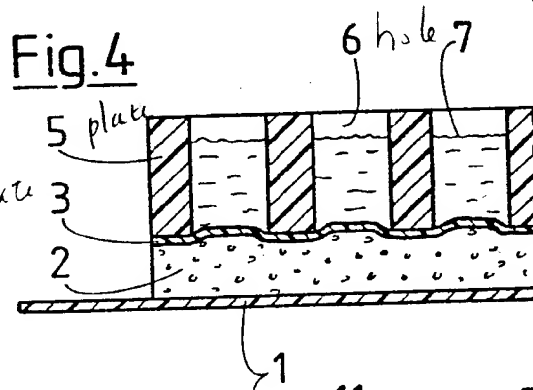


Fig. 5